Validierung in der Analytik

Inhaltsverzeichnis:

Zum Dokument ... 5

Was versteht man unter Validierung? ... 7

1 Begriffsbeschreibung der Validierung ... 7

2 Wer fordert eine Validierung ... 7

Validierung und Analytik ... 9

1 Validierungsthesen für die Analytik ... 9

2 Statistische Daten / Ausreißertests ... 9

3 Überprüfung des Messgeräts / Prüfmittelüberwachung ... 9

4 Verfahrensvalidierung / kritische Schritte einer Validierung ... 9

Validierungselemente und deren Überprüfung ... 11

1 Maximalumfang einer Validierung ... 11

2 Richtigkeit ... 11

2.1 Prüfung auf Richtigkeit ... 11

3 Selektivität ... 11

3.1 Prüfung auf Selektivität ... 11

3.1.1 Spezialfall Chromatographie ... 11

4 Wiederfindungsrate ... 12

4.1 Überprüfung der Wiederfindungsrate ... 12

5 Präzision ... 12

5.1 Messpräzision ... 12

5.2 Methodenpräzision ... 12

5.3 Wiederholpräzision / Vergleichspräzision ... 12

5.4 Laborpräzision ... 12

5.5 Akzeptanzkriterien / Reproduzierbarkeit ... 12

6 Genauigkeit ... 12

7 Linearität ... 13

7.1 Kalibrierfunktionen ... 13

7.2 Linearität des Gerätes ... 13

7.3 Linearität der Methode ... 13

7.4 Prüfung der Linearität ... 13

7.4.1 Einpunktkalibrierung ... 13

7.4.2 Auftragung S/c gegen c ... 13

7.4.3 Arbeitsbereich ... 13

8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze ... 13

8.1 Bestimmungsgrenze ... 13

8.2 Erfassungsgrenze ... 13

8.3 Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze ... 13

8.3.1 Überprüfung der Grenzen ... 13

9 Robustheit ... 14

9.1 Überprüfung der Robustheit ... 14

Umfang der Methodenvalidierung ... 15

1 Warum Validierung ... 15

Grundbegriffe der Methodenvalidierung **17**

Methodenvalidierung in der Analytik **19**

1 Prüfparameter **19**

Umfang der Methodenvalidierung in der Analytik **21**

1.1 Fließschema zur Methodenvalidierung einer „Spurenmethode" mittels Chromatographie (Reinheitsprüfung, Neben- und Abbauprodukte) **21**

2 Fließschema zur Methodenvalidierung von Identitätstests in der Chromatographie **23**

Qualitätsregelkarten **25**

1 Kontrollkarten als Qualitätssicherugnselement **25**

2 Qualitätssicherung im Labor **25**

3 Prinzipieller Aufbau einer Qualitätsregelkarte[3] **25**

3.1 Was kann in eine Kontrollkarte eingetragen werden **25**
3.2 Nachweis der Funktion eines Prozesses **25**
3.3 Vorteile einer Kontrollkarte **25**
3.4 Voraussetzungen für das Führen einer Kontrollkarte **26**
3.5 Einsatzgebiete, wichtigste Arten von Kontrollkarten **26**
3.6 Präzisionskontrolle **26**
3.7 Richtigkeitskontrolle **26**
3.8 Vorperiode **26**
3.9 Kontrollperiode **26**
3.10 Warngrenze / Eingriffsgrenze **26**
3.11 Annahmekarten **26**
3.12 Außer-Kontroll-Situation **26**
3.13 Average Run Length **27**
3.14 Periodische Schwankungen **27**
3.15 Retrospektive Überprüfungen **27**

Anhang **29**

1 Literaturliste zum Thema (Auswahl) **29**

2 Regelwerke in der AQS und Statistik (Auswahl) **29**

3 Abbildungsverzeichnis **29**

4 Gleichungsverzeichnis **29**

Zum Dokument

Die Methodenvalidierung ist ein wichtiges Instrument der Qualitätssicherung. Sie soll Auskunft darüber geben, ob eine Analysenmethode geeignet ist, eine vorgegebene spezifische Aufgabe zu erfüllen. Umfang und Durchführungsmodus einer Validierung hängen vom beabsichtigten Zweck ab.

Dieses Dokument stellt die einzelnen Validierungselemente vor und zeigt pragmatische Wege zur Durchführung.

Lesern, die an detaillierten Ausführungen interessiert sind, seien auf die Literatur am Ende des Dokumentes verwiesen.

Was versteht man unter Validierung?

1 Begriffsbeschreibung der Validierung

Unter Validierung versteht man den Nachweis und die Dokumentation der Zuverlässigkeit einer Methode. Die Definition nach DIN ISO 8402 lautet: Bestätigen aufgrund einer Untersuchung und durch Bereitstellung eines objektiven Nachweises, dass die besonderen Forderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt worden sind. Diese Definition ist sehr allgemein gehalten und lässt dem Fachmann freie Entscheidungsräume. Leider wird zunehmend seitens der Inspektoren und der Behörde bei Inspektionen oder Anmeldungen eine Liste mit Maximalforderungen stur „abgehakt“. Mit der Validierung beschäftigte man sich intensiver seit dem verstärkten Einzug von QS-Systemen in die Laboratorien.

2 Wer fordert eine Validierung

Besonders die Einführung der Akkreditierung nach EN 45001 und die Forderungen der amerikanischen Gesundheits- und Umweltbehörden (FDA, EPA) sind als Anstoß zu bewerten. Im Folgenden werden die Elemente der Validierung vorgestellt und eine pragmatische Umsetzung im analytischen Labor vorgeschlagen.

Validierung und Analytik

1 Validierungsthesen für die Analytik

Es fehlt eine verbindliche Definition des Begriffes Validierung speziell für die Analytik, auch der Umfang wird unterschiedlich festgelegt. Bei Spucker[1] finden sich 7 Validierungsthesen. Für die Analytik abgewandelt, könnten diese Thesen wie folgt lauten:

1. Validierung ist ein Arbeitsinstrument zur Qualitätssicherung neben anderen wie SPC (statistical process control).
2. Validierung ist produkt- und zweckspezifisch auszuführen. Die Verantwortung über Ausmaß und Art liegt beim Analytiker.
3. Validierung heißt, das Notwendige tun, um eine Eskalation zu vermeiden. Alle kritischen Schritte müssen validiert werden, aber nicht wahl- und kritiklos alles.
4. Methodenvalidierung beginnt am Besten beim Endergebnis und geht im Analysenablauf bis zum 1. Schritt zurück.
5. Validierung kann nicht durch Abhaken von Resultaten mittels Checkliste erfolgen.
6. Nach Möglichkeit sind die statistische Relevanz und damit die Messunsicherheit zu ermitteln. Eine fehlerhafte Analytik („wahrer" Wert) gibt es nicht.
7. Für Ergebnisse aus validierten Methoden sind Art und Häufigkeit der notwendigen Kontrollen festzulegen mit dem Ziel, den Gesamtanalysenaufwand zu minimieren, aber dennoch die erforderliche Ergebnissicherheit zu erzielen.

2 Statistische Daten / Ausreißertests

Im Rahmen der Validierung werden statistische Daten ermittelt. Oft muss der Anwender entscheiden, ob ein Wert nun ein Ausreißer ist oder nicht. Eine nicht zu empfehlende Praxis ist die subjektive Beurteilung. Nicht nur in einer Abteilung, sondern in ganzen Bereichen müssen objektive Kriterien zu einer Ja/Nein-Entscheidung festgelegt und zwingend befolgt werden (z.B. mittels Dixon-, Grubbs-Test oder 20 %-Abweichung vom Mittelwert). Sonst ist eine wichtige Voraussetzung der Vergleichbarkeit von Ergebnissen nicht erfüllt.

3 Überprüfung des Messgeräts / Prüfmittelüberwachung

Eine gute Methode kann nur in einem „guten" Gerät, „gute" Ergebnisse liefern. Die Messpräzision, d.h. die Güte der verwendeten Apparatur muss bekannt sein. Diese kann durch entsprechende Gerätetests ermittelt werden. Die im Rahmen der Prüfmittelüberwachung durchzuführende Kalibrierung kann bei einfachen Geräten gegebenenfalls die aufwändigeren Gerätetests ersetzen. Auf die Gerätetests wird hier nicht näher eingegangen (s. Dokument ALC 00297). In der Zwischenzeit bieten mehrere Hersteller entsprechende Softwaremodule an, welche die Durchführung dieser Tests erleichtern.

4 Verfahrensvalidierung / kritische Schritte einer Validierung

Die Einbeziehung aller relevanten Einflüsse auf das Ergebnis (Probenvorbereitung, Messung, Messgerät, Datengenerierung) wird durch den Begriff Verfahrensvalidierung unterstrichen. Doch scheint sich in der Analytik der Begriff der Methodenvalidierung durchzusetzen.

Bei der Validierung sollten gerade die kritischen Schritte der Methode überprüft werden. Wenn möglich und sinnvoll, sollte in besonderen Fällen die Probennahme in die Methodenvalidierung aufgenommen werden. Eine nicht repräsentative Probe kann das Ergebnis einer sonst hervorragenden Methode zunichte machen. Hat der Anwender im Labor keinen Einfluss auf die Probennahme, so sollten diese und eventuell auch der Probentransport sowie die Lagerung genau beschrieben und dokumentiert werden.

Folgende Voraussetzungen gelten für die Methodenvalidierung:

1. Der Zweck ist unmissverständlich definiert.
2. Es liegt eine ausgereifte, bereits optimierte Methode schriftlich vor. Diese Forderung ist nicht immer realisierbar. In der Praxis sind oft Methodenentwicklung und einzelne Schritte der Validierung (Selektivität, Linearität, Robustheit) miteinander verknüpft.
3. Das Gerät hat eine bekannte und akzeptierte Präzision (Messpräzision).
4. Das Personal ist mit der Methode vertraut.



5. Die verwendeten Chemikalien (chromatographische Säulen, Referenzsubstanzen, Lösungsmittel, Reagenzien etc.) sind von guter (und bekannter) Qualität.

Validierungselemente und deren Überprüfung

1 Maximalumfang einer Validierung

Der Maximalumfang einer Validierung umfasst Richtigkeit, Präzision (Wiederhol-, Labor- und Vergleichspräzision), Linearität, Wiederfindungsrate, Selektivität, Robustheit, Nachweisgrenze und Bestimmungsgrenze. Der tatsächlich notwendige Umfang hängt von Art und Zweck der Analytik ab. Wenn beispielsweise die Selektivität in der Produktanalytik (bekannter Wirkstoff in einer bekannten Formulierung) vermutlich keinen kritischen Punkt darstellt, ist deren Überprüfung in der Umweltanalytik (Identifizierung des Analyten) mit oft komplexen und unbekannten Matrices eminent. Die Messpräzision und die Robustheit der Methode sind elementare Forderungen für jede Art von Analytik.

2 Richtigkeit

Die Richtigkeit ist ein Maß für die Abweichung des Messwertes vom richtigen Wert (manchmal als „wahrer" Wert bezeichnet) aufgrund eines systematischen Fehlers.

Das Fehlen von systematischen Fehlern ist somit eine Grundvoraussetzung für die Richtigkeit. Weitere Voraussetzungen sind:

1. Die Methode ist selektiv.
2. Die Wiederfindungsrate beträgt nach jedem Schritt der Probenvorbereitung 100 % oder ist konstant und rechnerisch korrigierbar.

2.1 Prüfung auf Richtigkeit

1. Vergleich mit einem Referenz- oder Arbeitsstandard (Soll/Ist-Vergleich).
2. Vergleich mit einer unabhängigen, möglichst validierten Methode.
3. Aufstocken („Spiken" einer Probe).

Wenn bei bestimmten Proben (z.B. Wirkstoffe) keine der 3 Methoden anwendbar ist, kann als Kriterium für die Richtigkeit folgendes gelten:

Die Selektivität ist erwiesen, Linearität ist vorhanden, und die Kalibriergerade geht durch den Nullpunkt.

3 Selektivität

Oft werden die Begriffe Spezifität und Selektivität für den gleichen Sachverhalt verwendet, daher sei hier die korrekte Definition der beiden Begriffe aufgeführt:

Eine Methode arbeitet spezifisch, wenn sie die zu bestimmende Komponente ohne Verfälschung durch andere in der Probe vorhandene Komponenten erfasst.

Eine Methode ist selektiv, wenn sie verschiedene, nebeneinander zu bestimmenden Komponenten ohne gegenseitige Störungen erfasst.

3.1 Prüfung auf Selektivität

Prüfung auf Richtigkeit: Da Selektivität eine der Voraussetzungen für Richtigkeit ist, ist eine richtige Methode automatisch auch selektiv.

Vergleich mit einem Standard, der alle denkbaren Komponenten inkl. Matrix erhält.

Systematische Variation der Analysen- bzw. Messbedingungen.

Vergleich mit dem Ergebnis nach einem anderen Analysenprinzip.

3.1.1 Spezialfall Chromatographie

1. Ein pragmatischer (und gleichzeitig der sicherste!) Weg ist der Vergleich des erhaltenen Chromatogramms mit einem „Muster"-Chromatogramm, das sämtliche Nebenkomponenten, Verunreinigungen etc. enthält. Die Aussage zur Selektivität kann durch den Vergleich von chromatographischen Kenngrößen unterstützt werden (relative Retention, Peakbreite und Asymmetriefaktor).
2. Sukzessive Zugabe der einzelnen Analyten und Überprüfung der chromatographischen Auflösung.
3. Wechsel der Säule/DC-Platte und/oder der mobilen Phase.

4. Erhöhung der Peakkapazität, z.B. durch Online-Kopplung verschiedener chromatographischer Verfahren (LC-GC, LC-DC, SFC-GC) oder im Offline-Modus: „Schneiden" und Untersuchen der Fraktionen mit anderen Trennmethoden und/oder Spektroskopie.
5. Ratio-Plot: Detektion bei 2 Wellenlängen, Prüfung der Konstanz der Extinktionsverhältnisse.
6. Online-Spektrenaufnahmen und -vergleich (UV, MS) in aufsteigender/abfallender Peakflanke und im Maximum (ggf. Spektrendatenbank).
7. Peakformvergleich des Analyten in der Kalibrierlösung und der Probe (Peakbreite, Asymmetrie, Ableitungen).

4 Wiederfindungsrate

Mittels der Wiederfindungsrate wird überprüft, ob bei der Probenaufarbeitung (z.B. Extraktion, Derivatisierung, Injektion) möglicherweise ein Teil der Substanz „verschwindet".

4.1 Überprüfung der Wiederfindungsrate

Es werden insgesamt 3 Lösungen hergestellt und analysiert:

Lösung 1: zu V_1 ml Probenlösung V_2 ml Kalibrierlösung geben, man erhält Signal S_1.

Lösung 2: zu V_1 ml Probenlösung V_2 ml Lösungsmittel geben, man erhält Signal S_2.

Lösung 3: zu V_1 ml Lösungsmittel V_2 ml Kalibrierlösung geben, man erhält Signal S_3.

Die Wiederfindungsrate W errechnet sich:

$$W = \frac{(S_1 - S_2)}{S_3} * 100[\%]$$

Gleichung 1 : Wiederfindungsrate

5 Präzision

Man unterscheidet zwischen Systempräzision (Messpräzision) und Methodenpräzision.

5.1 Messpräzision

Die Messpräzision ist ein Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden. Sie wird durch die Mehrfachanalyse (z.B. sechsfach) eines Standards ermittelt. Die Forderung an die Messpräzision hängt vom Analysengerät ab. Bei der HPLC und GC sollte der Variationskoeffizient (Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert) $V_K < 1$ sein.

5.2 Methodenpräzision

Die Methodenpräzision beschreibt die zufällige Streuung der Analysenergebnisse. Sie wird durch eine mehrfache (meist sechsfache) Durchführung der gesamten Analyse, d.h. vom Abwiegen über die Probenvorbereitung bis zu der Messung und Befund ermittelt (6 Einwaagen realer Proben).

5.3 Wiederholpräzision / Vergleichspräzision

Es wird zwischen Präzision unter Wiederholbedingungen (Wiederholpräzision, Wiederholbarkeit: ein Labor, ein Gerät, ein Prüfer) und Präzision unter Vergleichsbedingungen (Vergleichspräzision, Vergleichbarkeit, Übertragbarkeit, Reproduzierbarkeit: mehrere Labors, mehrere Prüfer, mehrere Geräte) unterschieden

5.4 Laborpräzision

Das ist die Präzision innerhalb eines Labors, wenn die Bestimmung von verschiedenen Personen an verschiedenen Geräten und an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wird.

5.5 Akzeptanzkriterien / Reproduzierbarkeit

Die Akzeptanzkriterien hängen stark von den Forderungen bei der speziellen Fragestellung ab. Wird beispielsweise im Pharmabereich in der Regel für die Vergleichspräzision ein $V_K < 2$ verlangt, so sind in der Umweltpolitik V_K-Werte von etwa 5 und in der Medizin von 10 durchaus akzeptabel.

6 Genauigkeit

Die Genauigkeit ist kein Validierungselement, sondern der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision. Ein Ergebnis ist genau, wenn es frei von zufälligen und systematischen Fehlern ist.

Angemerkt sei an dieser Stelle, dass die Begriffe „Genauigkeit" und „Präzision" oft als synonyme Terme verwendet werden.

7 Linearität

7.1 Kalibrierfunktionen

Eine Methode ist in einem bestimmten Konzentrationsbereich linear, wenn das Messsignal direkt proportional zu der Analytkonzentration in der Probe ist (nicht im Standard!). „Direkt proportional" bedeutet nicht zwingend eine lineare Abhängigkeit zwischen Messsignal und Analytkonzentration! Aus diesem Grunde mag der Begriff „Analysenfunktion" oder Kalibrierfunktion treffender sein.

7.2 Linearität des Gerätes

Kalibrierfunktionen 2. Grades können und sollten gegebenenfalls verwendet werden. Ähnlich der Messpräzision kann hier mit einer Standardlösung die Linearität des Gerätes (Detektor) bestimmt werden.

7.3 Linearität der Methode

Die Linearität der Methode ist meist kleiner (selten gleich) als die Linearität des Detektorsystems. Gleichheit bedeutet, dass die Matrix und die Probenvorbereitung keine systematischen Fehler verursachen.

7.4 Prüfung der Linearität

7.4.1 Einpunktkalibrierung

Üblicherweise wird das Signal S gegen die Konzentration c aufgetragen. Die Steigerung $^{dS}/_{dc}$ ist ein Maß für die Empfindlichkeit der Methode. Wenn die Steigerung dS/dc konstant ist (linearer Bereich) und das Signal s bei c = 0 ebenfalls = 0 ist, ist eine Einpunktkalibrierung zulässig. Ansonsten sollten mindestens 5 Konzentrationen vermessen werden, um den mathematischen Zusammenhang zwischen Masse und Signal (Regressionsmodell) genau ermitteln zu können. Es ist nicht immer zweckmäßig, eine Gerade durch den Nullpunkt zu zwingen.

7.4.2 Auftragung S/c gegen c

Neben der klassischen Auftragung, Signal gegen Konzentration ($^{S}/_{c}$), hat sich die Auftragung des Quotienten aus Signal und Konzentration gegen die Konzentration c bewährt; Verdünnungsfehler im unteren Bereich werden einfach erkannt.

7.4.3 Arbeitsbereich

Im Zusammenhang mit der Linearität wird oft der Arbeitsbereich „range" genannt. Dieser ist der zwischen der niedrigsten und der höchsten Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, für den die geforderte Präzision und Genauigkeit bewiesen wurden.

8 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze ist die kleinste Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, die qualitativ noch erfasst werden kann (Ja/Nein-Entscheidung).

8.1 Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze ist die kleinste Konzentration (Menge) des Analyten in der Probe, die mit gegebener Präzision und Richtigkeit quantitativ bestimmt werden kann. Das zugrunde liegende mathematische Modell und die Bestimmungsmethoden sind in der DIN 32645 beschrieben.

8.2 Erfassungsgrenze

Sie gibt die Konzentration (Menge) an, die mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % nachgewiesen werden kann. Somit kann die Erfassungsgrenze vereinfacht als die doppelte Nachweisgrenze angesehen werden.

8.3 Überprüfung der Nachweis- und Bestimmungsgrenze

8.3.1 Überprüfung der Grenzen

Mit Hilfe von Makros in käuflichen (z.B. Excel) oder selbstgeschriebenen Softwareprogrammen ist die Überprüfung in Anlehnung an die DIN-Norm 32645 möglich.

In der chromatographischen Praxis gelten zumeist das zwei- bis dreifache Rauschen als Nachweisgrenze und das fünf- bzw. neun- bis zehnfache Rauschen als Bestimmungsgrenze.

Selbstverständlich entsprechen die ermittelten Werte einer Momentaufnahme; sie geben den aktuellen Gerätezustand wieder (Lampe, Güte der eingesetzten Chemikalien, etc.). Nach jedem Wechsel im System sollte die Bestimmung wiederholt werden. Ein pragmatischer Vorschlag zur Ermittlung der Bestimmungsgrenze stammt von Eurachem/D[2] (s. Abb. 1). Durch eine Verdünnungsreihe wird die kleinste Konzentration ermittelt, für die der Variationskoeffizient noch tolerierbar ist.

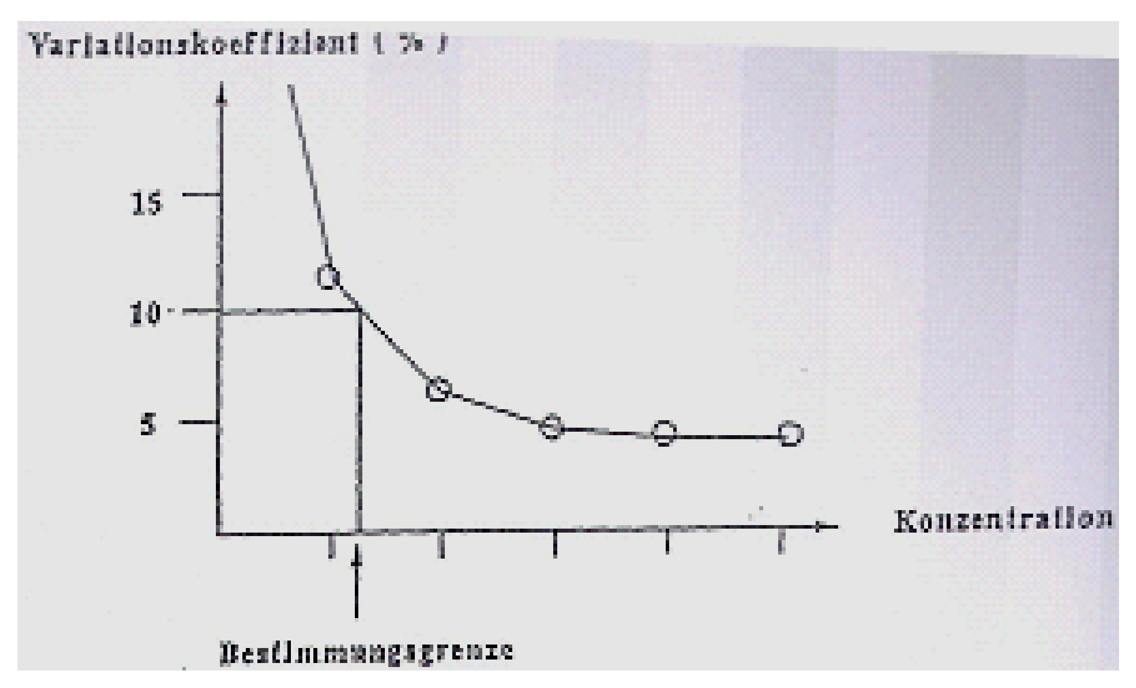


Abbildung 1 : Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik

Verdünnungsreihe aus Kalibrierlösungen, je 6 mal analysiert.

9 Robustheit

Eine Methode ist robust, wenn durch Änderung der Testbedingungen das Endergebnis nicht oder nur unwesentlich verfälscht wird. Als Maß für die Robustheit wird der Bereich genannt, in dem das Ergebnis von der Änderung eines oder mehrerer Parameter unabhängig ist, z. B. „Messergebnis konstant zwischen 30° C und 35° C, pH 5 bis 7, gemessen an den Geräten A, B und C".

9.1 Überprüfung der Robustheit

1. Vergleich der Messergebnisse zu Beginn und am Ende einer Analysenserie (Verfahrensstabilität).
2. Vergleich von Messergebnissen laborintern (Laborpräzision) und zwischen unterschiedlichen Labors (Vergleichbarkeit, Übertragbarkeit). Die Weiterführung dieses Gedankens, nämlich der Überprüfbarkeit als Kriterium der Robustheit, führt zu den Ringversuchen (ab ca. 30 bis 40 Labors).
3. Systematische Variation der Einflussparameter.

Umfang der Methodenvalidierung

1 Warum Validierung

Die Methodenvalidierung ist eine notwendige, qualitätssichernde Maßnahme, sie muss allerdings schnell durchzuführen sein und somit bezahlbar bleiben. Es gilt folgender Grundsatz: Der Aufwand und der Umfang der Validierung sollten in einem angemessenen Verhältnis zu den Forderungen stehen. Deswegen ist es wichtig, sich über Art und Ziel der Analytik im Klaren zu sein. So kann beispielsweise - wenn der Aufwand vertretbar ist - durch den Vergleich mit einer unabhängigen Methode die Richtigkeit der zu validierenden Methode belegt werden. Die Validierung wäre bereits damit erfolgreich beendet. Ein (aufwendiger) Ringversuch wiederum ermöglicht die Beurteilung einer Methode; hiermit werden die Präzision sowie die Robustheit der gesamten Methode überprüft.

In der Analytik kann man folgende Methodentypen unterscheiden: Identitätstests, Gehaltsbestimmung, quantitative Spurenmethode. Reicht beispielsweise im ersten Fall eine - allerdings sehr gründliche - Überprüfung der Selektivität aus, sind bei der qualitativen Bestimmung von z.B. Neben- oder Abbauprodukten sämtliche Validierungselemente zu überprüfen.

Grundbegriffe der Methodenvalidierung

Bezeichnung	englische Bezeichnung	Aussage über:
Genauigkeit	**accuracy**	**Systematische und zufällige Fehler:** Die Genauigkeit ist der Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision.
Richtigkeit	**trueness, accuracy of the mean**	**Systematische Fehler:** Die Richtigkeit ist das Maß für die Abweichung vom richtigen Wert (manchmal als "wahrer" Wert bezeichnet) aufgrund eines systematischen Fehlers. Belegt werden kann die Richtigkeit über die Wiederfindungsrate, internen Kontrollproben, ein 2. Verfahren oder zertifizierte Referenzproben.
Präzision	**precision**	**Zufällige Fehler:** Die Präzision ist ein Maß für die Streuung der Analysenwerte. Man unterscheidet zwischen Messpräzision (Systempräzision) und Methodenpräzision. **Messpräzision**: Maß für die Schwankungen, die durch das Analysengerät selbst verursacht werden. Die Ermittlung dieser Schwankungen erfolgt durch die Mehrfachanalyse (sechsfach) eines Standards. **Methodenpräzision**: Maß für die Streuung der Analysenergebnisse. Die Ermittlung dieser Schwankungen erfolgt durch mehrfache (sechsfache) Durchführung der gesamten Analysen, d. h. der Probenvorbereitung, der Messung und der Befundung.
Wiederhol-präzision	**repeatability**	**laborinterne Präzision:** (Wiederholbedingungen: ein Labor, ein Prüfer, ein Gerät).
Laborpräzision	**intermediate precision**	**Ein Labor, 2 Prüfer, 2 Geräte, 2 Tage**
Vergleichs-präzision	**reproducibility**	**Präzision im Vergleich Labor zu Labor:** (Vergleichbedingungen: mehrere Labors, mehrere Prüfer, mehrere Geräte).
Linearität	**linearity**	**Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration:** Das Messsignal muss proportional zu der Analytkonzentration in der Probe (nicht im Standard) sein, wobei eine lineare Abhängigkeit nicht zwingend ist. Zur Prüfung der Linearität wird üblicherweise das Signal S gegen die Konzentration c aufgetragen.
Wiederfin-dungsrate	**recovery**	**Ausbeute der Probenvorbereitung:** Überprüfung, ob bei der Probenaufarbeitung (z.B. Derivatisierung, Extraktion, Injektion etc.) ein Teil der Substanz "verschwindet".
Selektivität	**selectivity**	**Störung durch Begleitstoffe:** Fähigkeit eines Analyseverfahrens verschiedene Komponenten nebeneinander zu bestimmen.
Robustheit	**robustness**	**Störanfälligkeit durch veränderte Bedingungen (Analysenparameter, Gerät, Labor usw.)**
Nachweis-grenze	**detection limit**	**Kleinste nachweisbare Menge:** Ja/Nein-Entscheidung
Bestimmungs-grenze	**quantitation limit**	**Kleinste quantifizierbare Menge:** „Wieviel"-Entscheidung Mindestkonzentration (-Menge), die mit vorgegebener Wahrscheinlichkeit nachgewiesen werden kann.
Erfassungs-grenze (deutsche Erfindung)		

Tabelle 1 : Grundbegriffe der Methodenvalidierung

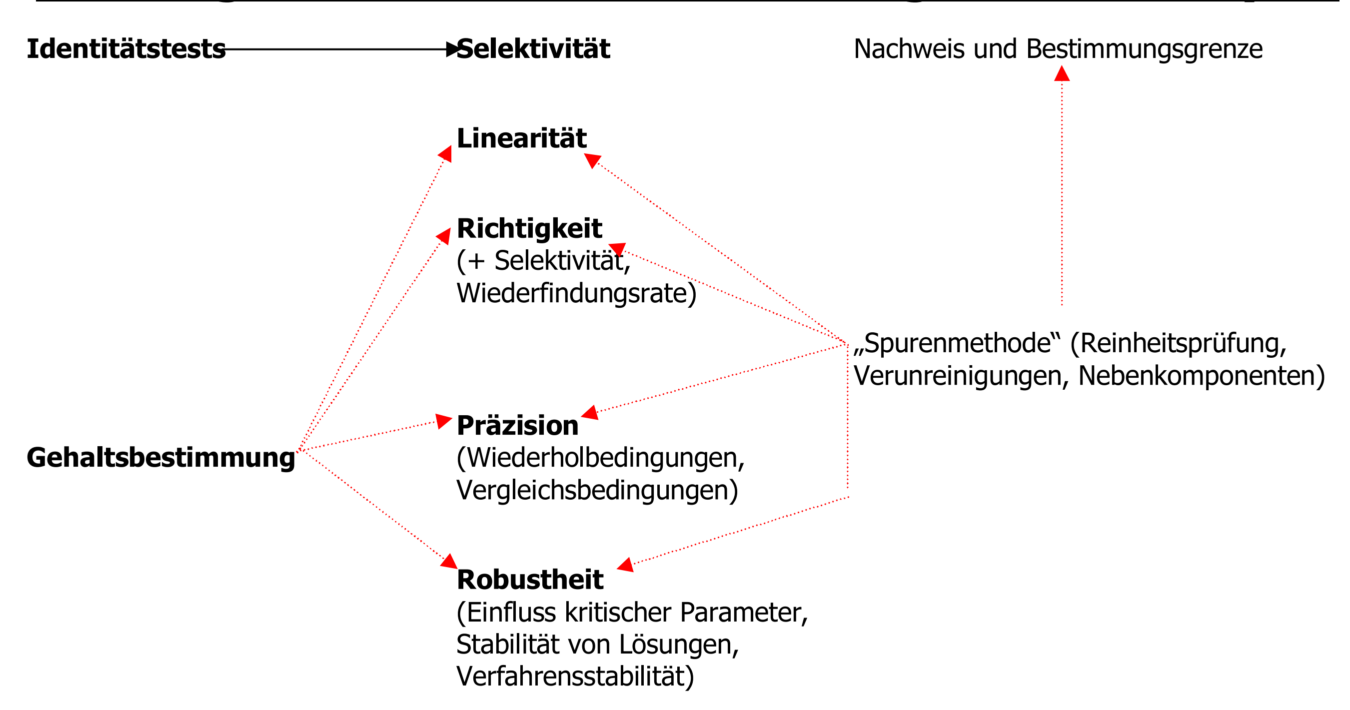
Methodenvalidierung in der Analytik

1 Prüfparameter

Bezeichnung	**Aussage über**
Richtigkeit	systematische Fehler
Präzision	zufällige Fehler
• Wiederholbarkeit (Wiederholpräzision)	laborintern
• Vergleichbarkeit (Vergleichspräzision)	verschiedene Labors
Robustheit	Abhängigkeit von variierenden Bedingungen
• Verfahrensstabilität („robustness“)	Störanfälligkeit durch veränderte Parameter (pH, Temperatur, usw.)
• Übertragbarkeit („regedness“) (Wiederholbarkeit, Vergleichbarkeit)	Störanfälligkeit durch Wechsel von Anwender, Gerät, Labor
Selektivität	Fähigkeit zur Bestimmung mehrerer Komponenten nebeneinander
Wiederfindungsrate	Ausbeute der Probenvorbereitung
Linearität	Abhängigkeit: Signal / Konzentration
Nachweisgrenze	kleinste nachweisbare Menge (Konzentration)
Bestimmungsgrenze	kleinste qualifizierbare Menge (Konzentration)
Spezifität	Störanfälligkeit gegenüber Begleitkomponenten
Messbereich (Range), dynamischer Arbeitsbereich	Konzentrationsbereich für erlaubte quantitative Aussage
Unsicherheit, Vertrauensintervall	Schwankungsbereich des Analysenergebnisses (Messwertes)
Reproduzierbarkeit	Wiederholpräzision innerhalb kurzer Zeitabstände
Genauigkeit	Oberbegriff für Richtigkeit und Präzision

Tabelle 2 : Prüfparameter der Methodenvalidierung

Umfang der Methodenvalidierung in der Analytik



1.1 Fließschema zur Methodenvalidierung einer „Spurenmethode" mittels Chromatographie (Reinheitsprüfung, Neben- und Abbauprodukte)

Dringender Hinweis: Bei Bedarf Probennahme, -Transport und Lagerung validieren oder zumindest sorgfältig dokumentieren

Stufe 1 über | **Prüfpunkt / Vorgehen** | **Erkenntnis / Aussage**

Messpräzision / Methodenpräzision
6 * Standard(1) bzw. 6 reale Proben 2)

(1) Wie ist die Streuung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät?

(2) Wie ist die Streuung meiner Ergebnisse bedingt durch das Gerät plus Methode?

Selektivität

Ist die Methode überhaupt selektiv für meine Probe?

Bekannte Probe

Vergleich mit einem Standard, der alle Komponenten enthält

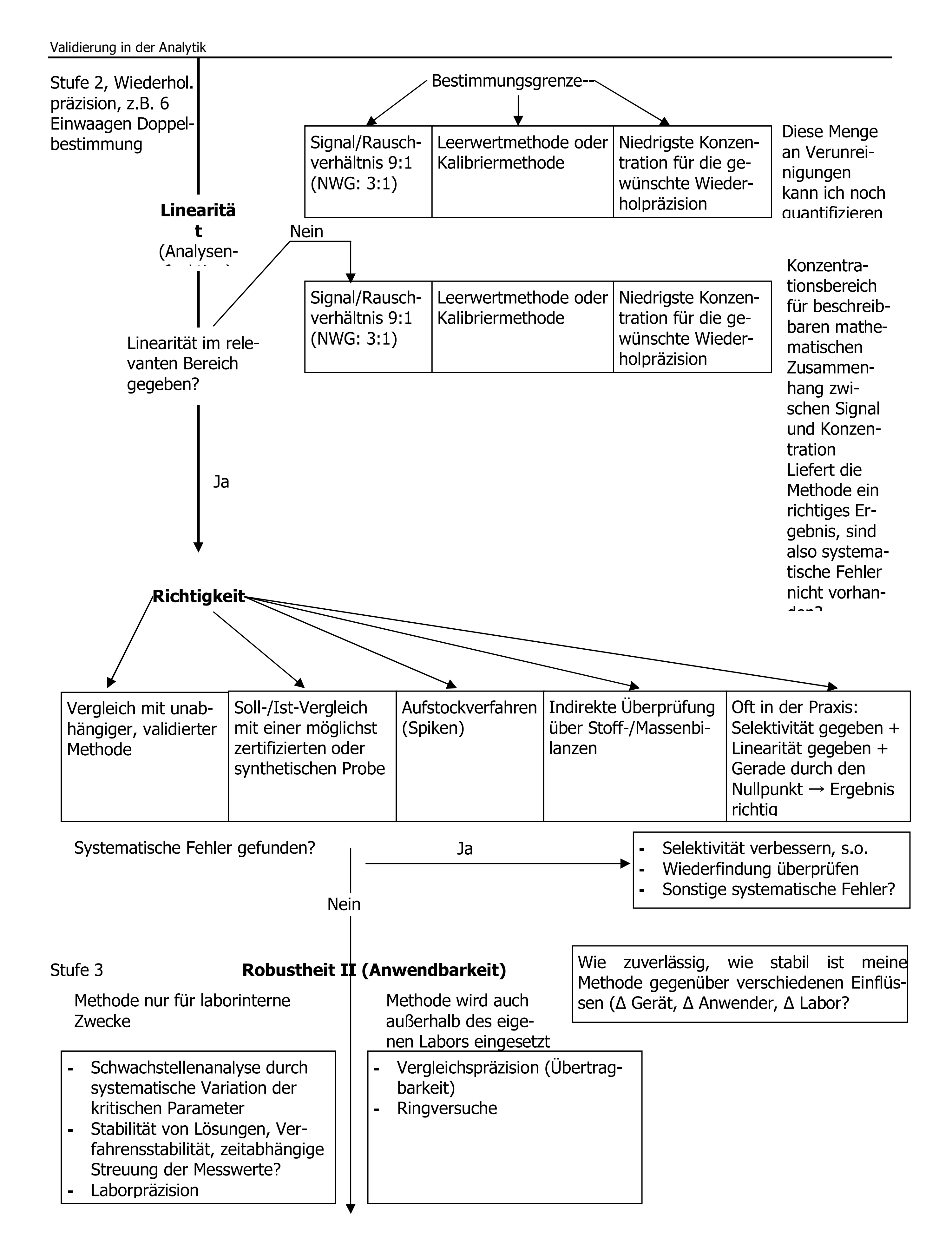
Unbekannte Probe

Systematisch Variation der Analysenbedingungen	Zweites Analysen- bzw. Trennprinzip verwenden	Substanz- oder elementspezifische Messung bzw. selektive Detektion, z.B. ^{31}P-NMR, spezielle Sensoren, Gen-Antigen-Wechselwirkungen	Orthogonale Trenntechniken, offline/online Kopplungen, z.B. Chromatographie / Spektroskopie

Robustheit 1
(Methodenrobustheit)

Δ pH; Δ Temperatur
Δ I, usw.

Wie beeinflussen kleine Änderungen in der Methode mein Ergebnis?



Stufe 2, Wiederhol. präzision, z.B. 6 Einwaagen Doppelbestimmung
Bestimmungsgrenze
Signal/Rauschverhältnis 9:1 (NWG: 3:1)
Leerwertmethode oder Kalibriermethode
Niedrigste Konzentration für die gewünschte Wiederholpräzision
Diese Menge an Verunreinigungen kann ich noch quantifizieren
Linearität
(Analysen-
Nein
Signal/Rauschverhältnis 9:1 (NWG: 3:1)
Leerwertmethode oder Kalibriermethode
Niedrigste Konzentration für die gewünschte Wiederholpräzision
Konzentrationsbereich für beschreibbaren mathematischen Zusammenhang zwischen Signal und Konzentration
Linearität im relevanten Bereich gegeben?
Ja
Liefert die Methode ein richtiges Ergebnis, sind also systematische Fehler nicht vorhan-
Richtigkeit
Vergleich mit unabhängiger, validierter Methode
Soll-/Ist-Vergleich mit einer möglichst zertifizierten oder synthetischen Probe
Aufstockverfahren (Spiken)
Indirekte Überprüfung über Stoff-/Massenbilanzen
Oft in der Praxis: Selektivität gegeben + Linearität gegeben + Gerade durch den Nullpunkt → Ergebnis richtig
Systematische Fehler gefunden?
Ja
- Selektivität verbessern, s.o.
- Wiederfindung überprüfen
- Sonstige systematische Fehler?
Nein
Stufe 3
Robustheit II (Anwendbarkeit)
Wie zuverlässig, wie stabil ist meine Methode gegenüber verschiedenen Einflüssen (Δ Gerät, Δ Anwender, Δ Labor?
Methode nur für laborinterne Zwecke
Methode wird auch außerhalb des eigenen Labors eingesetzt
- Schwachstellenanalyse durch systematische Variation der kritischen Parameter
- Stabilität von Lösungen, Verfahrensstabilität, zeitabhängige Streuung der Messwerte?
- Laborpräzision
- Vergleichspräzision (Übertragbarkeit)
- Ringversuche
ENDE DER MESSUNG

Nach den Messungen gilt nun, Antworten auf folgende Fragen zu geben:

→ Ist die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet, z.B. Streuung der Methode mit den Spezifikationsanforderungen vereinbar? (Methodenfähigkeit) Wie viel Prozent der Gesamtstreuung der Werte fällt auf die Analytik?

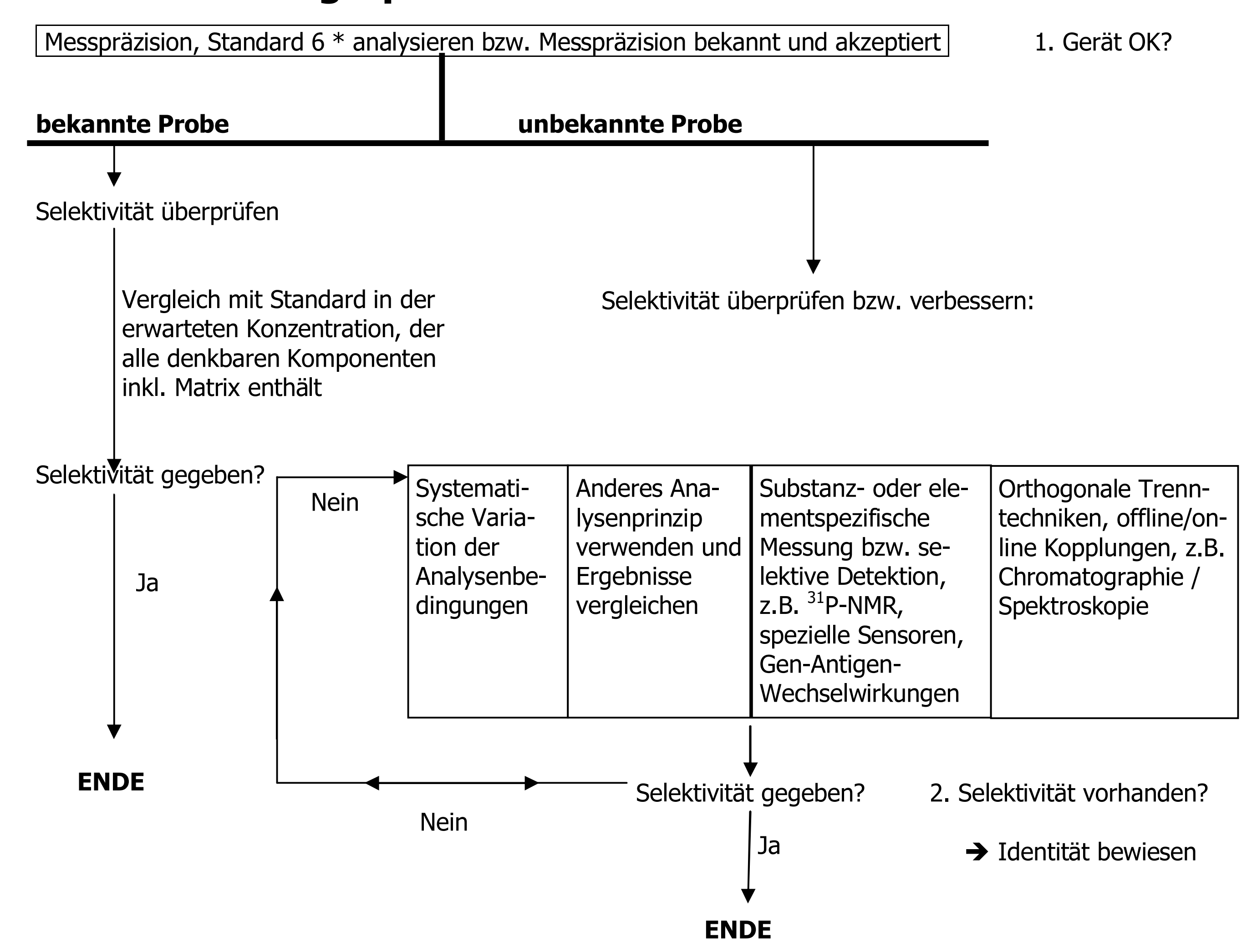
→ Für welchen Konzentrationsbereich (range) sind obige Aussagen gültig?

→ Wie ändern sich die erhaltenen Werte in Abhängigkeit von der Zeit? Trends erkannt? Soll SPC-Einführung empfohlen werden?

→ Sind die kritischen Punke der Methode identifiziert und herausgestellt? Empfehlungen für die Routineanwender?

ENDE DER VALIDIERUNG

2 Fließschema zur Methodenvalidierung von Identitätstests in der Chromatographie



Qualitätsregelkarten

1 Kontrollkarten als Qualitätssicherugnselement

Jedes Routinelabor muss seine Befähigung und Eignung nachweisen, indem es aufzeigt, dass es zuverlässig richtige Werte mit einer bekannten und akzeptablen Präzision bestimmt. Dieser Nachweis kann sowohl durch die Teilnahme an Ring- bzw. Vergleichsversuchen (externe Qualitätssicherung) als auch durch Führen von Kontrollkarten (interne Qualitätssicherung) erbracht werden.

2 Qualitätssicherung im Labor

Zur Überwachung der Zuverlässigkeit von Prozessen, insbesondere im Produktionsbereich, werden diese so genannten Regelkarten schon seit langem verwendet. Mit der zunehmenden Bedeutung der Qualitätssicherung im Labor werden sie immer stärker auch in der Analytik eingesetzt. Der zu überwachende Prozess ist hier das analytische Messverfahren selbst.

Die Abbildung zeigt beispielhaft den Aufbau einer Qualitätsregelkarte.

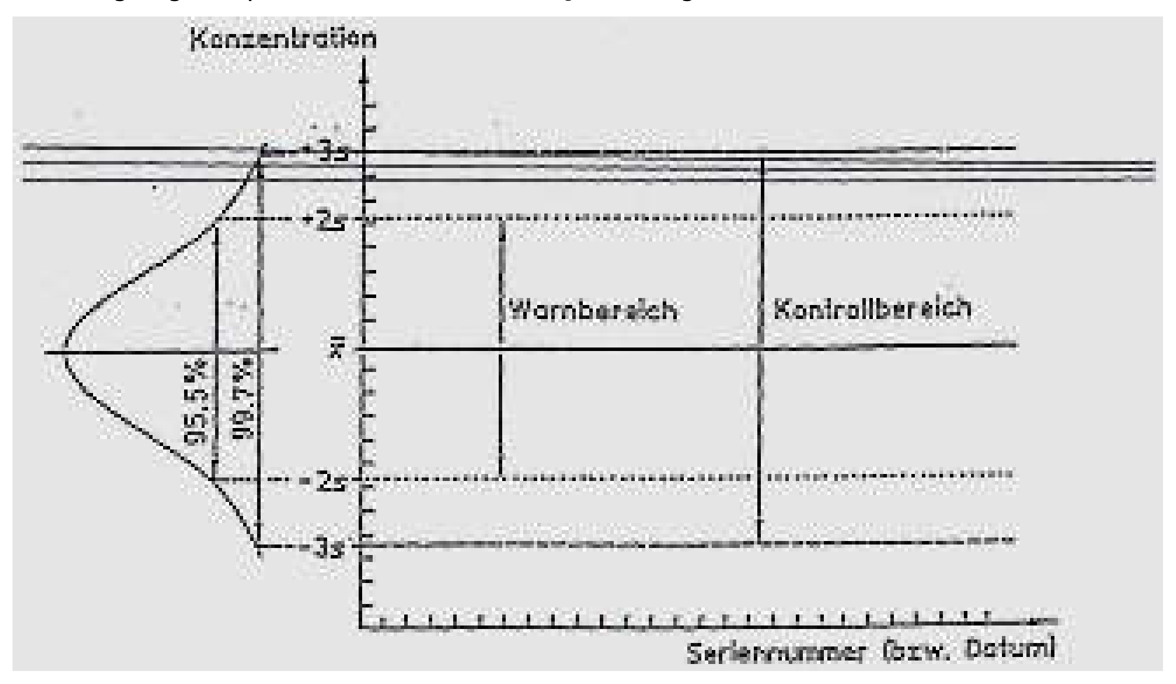


Abbildung 2 : Prinzipieller Aufbau einer Kontrollkarte

3 Prinzipieller Aufbau einer Qualitätsregelkarte[3]

3.1 Was kann in eine Kontrollkarte eingetragen werden

In dieser Karte können die Messergebnisse einer stets gleichen Kontrollprobe, die zusammen mit den Routineproben analysiert wird, eingetragen werden. Messwerte oder daraus ermittelte Kennwerte, wie z.B. Streubreite aus Mehrfachbestimmungen, werden gegen die Zeit aufgetragen. So wird anhand weniger „Spielregeln" die visuelle Beurteilung des Prozesses und gegebenenfalls die Einleitung von Überprüfungs- oder Korrekturmaßnahmen ermöglicht.

3.2 Nachweis der Funktion eines Prozesses

Gleichzeitig kann das Funktionieren eines Prozesses nachgewiesen und damit das System im aktuellen Zustand validiert werden.

3.3 Vorteile einer Kontrollkarte

Die entscheidenden Vorteile der Kontrollkartentechnik sind:

- → Alle Mitarbeiter treffen ohne subjektive Einflüsse dieselben Entscheidungen.
- → Korrigierende Einflüsse können schnellstmöglich veranlasst werden.
- → Retrospektive Beurteilungen des Systemzustandes sind leicht möglich (Qualitätsnachweis).
- → Das Auftreten von systematischen Fehlern und Trends kann visuell leicht und zeitnah erkannt werden.

3.4 Voraussetzungen für das Führen einer Kontrollkarte

Selbstverständlich ist für den Einsatz von Kontrollkarten in der Analytik Voraussetzung, dass die Analysenprozesse sporadisch oder regelmäßig wiederholen, d.h. dass derselbe Analyt in einer möglichst wenig veränderten Matrix in einem überschaubaren Konzentrationsbereich immer wieder bestimmt wird. Einsatzgebiete sind daher vor allem die Freigabe von Chargen eines Produktionsprozesses, die routinemäßige Analytik in medizinischen Laboratorien und die regelmäßige Kontrolle bestimmter Abwässer.

3.5 Einsatzgebiete, wichtigste Arten von Kontrollkarten

Es gibt verschiedene Arten von Kontrollkarten. Im analytischen Labor sind neben der mit Abstand am wichtigsten Mittelwertkontrollkarte außerdem die Wiederfindungs-, die Blindwert- sowie die Spannweitenkontrollkarte von Bedeutung. (Im Folgenden sei mit dem Begriff Kontrollkarte stets die Mittelwertkontrollkarte gemeint, sowie nicht anderes erwähnt.)

3.6 Präzisionskontrolle

Grundsätzlich können Kontrollproben sowohl zur Erkennung zufälliger Fehler (Präzisionskontrolle) als auch systematischer Fehler (Richtigkeitskontrolle) verwendet werden. Bei der Präzisionskontrolle werden die Werte der Kontrollprobe mit den zuvor gemessenen Werten der Kontrollprobe mit den zuvor gemessenen Werten derselben Probe verglichen.

3.7 Richtigkeitskontrolle

Bei der Richtigkeitskontrolle werden die Werte mit einem gegebenen Bezugswert verglichen. Der zu überprüfende Messwert (meist der Gehalt an Analyt) muss bei einer Richtigkeitskontrolle also bekannt sein. Wegen des dazu erforderlichen Messaufwandes bei der Herstellung sind Richtigkeitskontrollproben grundsätzlich teurer als Präzisionskontrollproben.

3.8 Vorperiode

Während einer Vorperiode werden zunächst Daten gesammelt, aus denen über Mittelwerte und Standardabweichung die Warn- und Eingriffsgrenzen ermittelt werden. Diese Daten können auch zur Validierung der Methode verwendet werden. Üblicherweise umfasst eine Vorperiode 20 Werte. Erst danach kann eine Qualitätsregelkarte genutzt werden.

3.9 Kontrollperiode

Wichtig ist, dass die Prüfbedingungen in der Vor- und der anschließenden Kontrollperiode vergleichbar sind.

3.10 Warngrenze / Eingriffsgrenze

Als Warngrenze wird zumeist ein Band der Breite 4 * s (Mittelwert ± 2 * s, mit s als Standardabweichung der Vorperiode), als Eingriffsgrenze ein Band der Breite 6 * s (Mittelwert ± 3 * s) festgelegt.

3.11 Annahmekarten

Im Idealfall, d.h. der Prozess befindet sich unter statistischer Kontrolle, und lediglich zufällige, aber keine systematischen Fehler sind wirksam, befinden sich im 1. Band 95,5 % und im letzteren 99,7 % aller Messwerte. Sind bereits Forderungen, z.B. aus Spezifikationen, vorhanden, so werden durch diese die Eingriffsgrenzen bzw. Grenzwerte festgelegt während die Warngrenzen entfallen. Man spricht in diesem Fall von Annahmekarten bzw. Annahme-Qualitätsregelkarten.

3.12 Außer-Kontroll-Situation

Beim Auftreten von Außer-Kontroll-Situationen müssen besondere Maßnahmen ergriffen werden. Dies kann im einfachsten Fall eine visuelle Systemüberprüfung oder eine Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse sein, in schweren Fällen aber auch zum Sperren bzw. der Reparatur eines Gerätes führen. Die Außer-Kontroll-Situationen stellen also die Spielregeln dar, die besondere Maßnahmen unabhängig vom persönlichen Ermessen des Operators auslösen.

Als Außer-Kontroll-Situationen gelten:

- → ein Wert außerhalb der Kontrollgrenzen;
- → 7 Werte in Folge ansteigend bzw. abfallend;
- → 7 sieben Werte in Folge über bzw. unter dem Mittelwert;
- → 2 von 3 Werten in Folge außerhalb der Warngrenzen.

Treten solche Situationen auf, so sollte - selbst wenn keine Ursache gefunden werden kann - eine schriftliche Bewertung der Qualitätsdokumentation erfolgen. Es ist nämlich durchaus nicht zwingend, dass Außer-Kontroll-Situationen auf Unregelmäßigkeiten oder Fehler hinweisen.

3.13 Average Run Length

Rein statistisch bedingt führen zufällige Fehler von Zeit zu Zeit ebenfalls zu Außer-Kontroll-Situationen, obwohl alles in bester Ordnung ist. Quantifiziert wird dieses „Risiko" durch die Average Run Length (ARL), also die Laufzeit bis zum Auftreten einer Außer-Kontroll-Situation, wenn der Prozess sich vollkommen unter statistischer Kontrolle befindet.[4]

3.14 Periodische Schwankungen

Eine Kontrollkarte verhält sich sozusagen wie eine Alarmanlage, bei der eine hohe Ansprechempfindlichkeit stets durch die ebenfalls erhöhte Gefahr von Fehlalarmen erkauft wird. Der Wert einer Kontrollkarte erweist sich aber nicht erst im Auftreten von Außer-Kontroll-Situationen. Nützliche Informationen z.B. über periodische Schwankungen oder eine Verringerung der Streubreite lassen sich aus ihnen ablesen.

3.15 Retrospektive Überprüfungen

Gerade bei der retrospektiven Überprüfung von Vermutungen („Sind die Messwerte seit dem Wechsel der Kalibriersubstanz erhöht?") zeigen Kontrollkarten ihren praktischen Nutzen. Zweifellos bedeutet das Führen von Kontrollkarten einen zusätzlichen Aufwand, der finanzierbar sein muss. Die zweitaufwenige Erstellung per Hand wird aber mehr und mehr durch Computerprogramme abgelöst. von einem modernen LIMS wird man also in Zukunft umfassende Möglichkeiten zum Führen von Kontrollkarten erwarten, wie die Online-Datenübernahme von Messgeräten und eine automatische Steuerung von Maßnahmen bei Außer-Kontroll-Situationen, beispielsweise Alarmauslösung, Wiederholung einer Analyse oder Sperren eines Gerätes. Neben den Kontrollkarten ist das Schätzen der Messunsicherheit ein bewährtes, billiges, schnelles und bereits akzeptiertes Werkzeug der Qualitätssicherung.

Eine Methode wird in einzelne Schritte zerlegt, z.B. Probenvorbereitung, Messung, Befundung. Der/die Fachmann/-frau schätzt aus den gemachten Erfahrungen usw. den Fehler der einzelnen Schritte. Hier wird zwischen 2 Extremen, dem günstigsten und dem ungünstigsten Fall, unterschieden („best/worst case"). Die geschätzten Fehler der einzelnen Schritte werden zum Quadrat genommen, die Quadrate addiert und aus der Summe die Wurzel gezogen. Der geschätzte Fehler der Methode liegt zwischen den zwei extremen Fällen („best case", „worst case"). Diese in Kürze beschriebene Möglichkeit eignet sich für einmalige Fragestellungen, z.B. im F+E-Bereich. Genaueres zum Schätzen der Messunsicherheit findet sich in:

Kromidas, Validierung in der Analytik, Wiley-VCH.

Anhang

1 Literaturliste zum Thema (Auswahl)

1. Funk, Damman, Vonderheld, Oehlmann: Statistische Methoden in der Wasseranalytik (VCH-Verlag, Weinheim [1989])
2. Funk, Damman, Donneveert: Qualitätssicherung in der Wasseranalytik (VCH-Verlag, Weinheim [1992])
3. Kromidas (Hrsg.): Qualität im analytischen Labor (VCH-Verlag, Weinheim [1995])
4. Gottwald: Statistik für Anwender (VCH-Verlag, Weinheim [1999])
5. Kromidas (Hrsg.): Validierung in der Analytik (VCH-Verlag, Weinheim [1999])
6. Kromidas (Hrsg.): Handbuch: Validierung in der Analytik (VCH-Verlag, Weinheim [2000])
7. Sachs, Lothar: Angewandte Statistik (Springer Verlag, Berlin [1975])
8. Doerffel: Statistik in der Analytik (VEB Grundstoff-Verlag, Leipzig [1984])
9. Ehrenberg: Statistik oder der Umgang mit Daten (VCH-Verlag, Weinheim [1993])
10. Qualitätssicherung und angewandte Statistik (ISO-Normen)
    Taschenbuch
    223: Begriffe, Normen
    224: Verfahren, 1. Normen
    225: Probenahme und Annahmestichproben DIN 53803T
    226: QS-Systeme, Normen
    [Beuth-Verlag, Berlin/Köln [1995])
11. ICH (International Conference on the Harmonization of Technical Requirements fort he Registration of Pharmaceuticals for Human Use [1990])

2 Regelwerke in der AQS und Statistik (Auswahl)

DIN 32645	Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenzen
DIN 38402 A41	Ringversuche
DIN 38402 A42	Ringversuche und statistische Auswertung
DIN 38402 A51	Kalibrierung von Analysenverfahren
DIN 38402 A51	Gleichwertigkeit zweier Analysenverfahren
DIN 55350	Begriffe des QS und Statistik
ISO 5725	Accuracy (trueness and precision)
ISO 8402	Qualität , Begriffe
ISO 9000	Qualitätsmanagement
ISO 9001	QS-System – Modell zur Darlegung von QS in Entwicklung, Produktion und Kundendienst
ISO 9002	QS-System-Modell in der Montage und Produktion
ISO 9003	QS-System – Modell in der Endprüfung
ISO 9004	Qualitätsmanagement und Elemente der QS – ein Leitfaden
ISO 17025	Richtlinien zum Betreiben von Prüf- und Kalibrierlaboratorien

3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 : Bestimmungsgrenze in der instrumentellen Analytik 14
Abbildung 2 : Prinzipieller Aufbau einer Kontrollkarte 25

4 Gleichungsverzeichnis

Gleichung 1 : Wiederfindungsrate 12